(9.)

OSPEDALE MAGGIORE DI MILANO - ISTITUTO DI ANATOMIA PATOLOGICA
(DIRETTORE PROF. DOTT. C. ZENONI)

CORRADO DA FANO
(VICE - DIRETTORE)

MODIFICAZIONE DEL METODO DI BIELSCHOWSKY PER LO STUDIO DEL COSIDETTO TESSUTO RETICOLARE

(CON PRESENTAZIONE DI PREPARATI)

« COMUNICAZIONE FATTA NELLA SEDUTA DEL GIUGNO 1914 »

ESTRATTO DAGLI ATTI DELLA SOCIETÀ LOMBARDA DI SCIENZE MEDICHE E BIOLOGICHE
VOLUME III. FASCICOLO 4.

OSPEDALE MAGGIORE DI MILANO - ISTITUTO DI ANATOMIA PATOLOGICA
(DIRETTORE PROF. DOTT. C. ZENONI)

23 D 25

CORRADO DA FANO
(VICE-DIRETTORE)

MODIFICAZIONE DEL METODO DI BIELSCHOWSKY PER LO STUDIO DEL COSIDETTO TESSUTO RETICOLARE (1)

(CON PRESENTAZIONE DI PREPARATI)

I buoni risultati ottenuti dall'uso sistematico di alcune varianti da me introdotte nel metodo di Bielschowsky (2) per renderlo più facilmente e sicuramente applicabile allo studio del cosidetto tessuto reticolare, mi hanno indotto a rendere note tali varianti affinchè anche altri possa eventualmente trarne profitto.

È noto che l'applicazione del metodo di B. all'esame di organi parenchimali (fegato, rene, milza ecc.) tale quale esso venne elaborato dall'A. per lo studio degli elementi

(1) Gitterfasern. Fibrille precollagene. Precollageno. Fine tessuto di sostegno. Tessuto a graticciata.

(2) Non esiste un metodo unico di Bielschowsky ma varianti diverse, proposte dallo stesso A., di un medesimo metodo. Per debito di chiarezza riferisco qui quella che ha trovato più larga applicazione e che, con piccole differenze, è riportata nelle edizioni recenti dei trattati di tecnica microscopica. A me venne dettata dall'A. nel Maggio 1908 quando fui a visitarlo a Berlino. È a questa variante che mi riferisco nella presente comunicazione, riserbandomi di ritornare sull'argomento in altro lavoro.

1. Fissazione in formalina al 20 %

nervosi, se riesce talvolta a risultati veramente buoni ed istruttivi, ne dà più spesso dei poco soddisfacenti od incompleti od anche affatto negativi. Ciò che sopratutto spiace nei preparati allestiti secondo le norme originali di B., è il frequente formarsi di un numero talora grandissimo di precipitati, i quali, anche quando siano situati, come di solito avviene, in un piano molto superficiale delle sezioni e non aderiscano pertanto alla fine trama di sostegno in esame, disturbano tuttavia la visione, rispettivamente il giudizio, dei preparati stessi.

Inoltre, anche quando per effetto di esercizio e — sia pur detto — di buona fortuna, si riesce ad allestire secondo le norme classiche di B. discreti o buoni preparati

---

2. Lavaggio in acqua corrente per 1-6 ore.

3. Sezionare col microtomo a congelazione.

4. Le sezioni si raccolgono in acqua distillata ove si lasciano da 1 a 6 ore. dopo di che si passano in $AgNO_3$ al 2% per 2h

5. Lavare in acqua distillata e passare le sezioni in una soluzione ammoniacale d'argento da prepararsi al momento dell'uso nel modo seguente: A 5 cc. di soluzione di Ag No_3 al 20 % si aggiungono 5 goccie d'idrato sodico al 40 %; poi ammoniaca, goccia a goccia, sino a soluzione del precipitato formatosi. Evitare un eccesso di ammoniaca Allungare a 25 cc. Filtrare. Le sezioni rimangono nella soluzione 10-15'.

6. Passare rapidamente le sezioni per acqua distillata. Immergerle in formalina al 20 % ove si lasciano finchè si formano nubecole bianche.

7. Lavare in acqua fontis per due minuti, trasportare in una soluzione al 2 ‰ di cloruro d'oro acidulata con qualche goccia d'acido acetico, sino a che il colore giallo-brunastro delle sezioni è scomparso.

8. Lavare nuovamente. Trasportare in una soluzione al 5 % di iposolfito sodico. Pochi minuti di permanenza sono sufficienti.

9. Lavare; disidratazione con alcooli 70°, 80°, 95°, xilolo fenico. Balsamo.

di organi parenchimali senza l'inconveniente di precipitati, ne risultano tuttavia immagini quasi sempre nel loro complesso troppo oscure e quindi di difficile analisi per l'eccessiva impregnazione sia della fine trama di sostegno, sia degli elementi proprî degli organi o tessuti in esame.

La personale esperienza inoltre può facilmente insegnare come l'impregnazione del cosidetto tessuto reticolare di certi organi, p. es. della milza, sia sottoposta al più incomprensibile capriccio. A parità di ogni altra condizione (freschezza maggiore o minore dei pezzi, durata del tempo di fissazione, ecc.) sezioni tutte identicamente e contemporaneamente trattate, nei medesimi recipienti e cogli stessi liquidi, si presentano poi all'osservazione in gradazioni diversissime di riuscita, le quali possono variare dalla negatività dei reperti ai risultati più soddisfacenti. In uno stesso preparato non è affatto raro l'osservare l'alternarsi di zone ottimamente colorate con altre affatto incolori; striscie ed isole di perfetta impregnazione immediatamente contigue a tratti oscurati da molteplici e grossolani precipitati.

È bene infine rilevare che seguendo le norme classiche di B., si ottengono talvolta preparati, i quali, esaminati con medî ed anche abbastanza forti ingrandimenti, si direbbero perfetti. Le fibre costituenti il cosidetto tessuto reticolare sembrano — e si potrebbe anche dire sono — impregnate nelle loro ramificazioni più fini. Però il loro esame con obbiettivi ad immersione omogenea, lascia subito riconoscere, che il rilievo della fine trama di sostegno non è dovuto ad una sua uniforme colorazione, bensì alla deposizione lungo i filamenti che la compongono, di granulazioni estremamente fini ma purtanto distinte le une dalle altre e bene riconoscibili. Queste deposizioni di granuli, i quali sono comparabili a serie di minutissimi cocchi, seguono esatta-

mente le fibrille della trama e poggiano evidentemente su di esse; costituiscono pertanto un fenomeno diverso, sebbene verosimilmente ad esso molto prossimo, della formazione dei comuni e grossolani precipitati.

Le cause precise di tanta capricciosità di un metodo il quale ha reso ed ancora può rendere molti buoni servigi nello studio di parecchie particolarità strutturali, normali e patologiche, sfuggono per ora ad una esatta determinazione; è stata però la loro indagine ciò che mi ha condotto all'elaborazione delle modificazioni, che verrò man mano esponendo.

Per quanto nulla di scientificamente provato si possa dire sulle cause intime che determinano l'impregnazione metallica di certi sistemi di fibre piuttosto che di certi altri, è evidente tuttavia che, almeno per quanto riguarda il metodo di B. e le sue applicazioni allo studio del cosidetto tessuto a graticciata, i buoni, rispettivamente i cattivi, risultati del metodo, dipendono fondamentalmente dalle condizioni, e con ogni probabilità anche dal tempo, nei quali avviene la riduzione del nitrato d'argento per opera della formalina. E poichè il metodo si basa essenzialmente su tale fenomeno, poichè sul modo della sua manifestazione debbono avere influenza differenze anche minime, così era già tracciata la via per cercare, mediante saggi empirici, di eliminare almeno tutto ciò che poteva disturbare l'utile riuscita della reazione.

Gli scopi da raggiungersi erano essenzialmente i seguenti: 1. Praticità d'esecuzione. 2. Costanza di risultati positivi. 3. Allestimento di preparati esenti da precipitati e da formazioni granulari, di quanto più chiara e facile interpretazione possibile.

Circa il primo punto mi è sembrato utile, anzitutto, il discostarmi il meno possibile dalle norme date del B. almeno per quanto riguarda il fissante; in secondo luogo il cercare di stabilire se i tempi di permanenza delle sezioni nei varii bagni potessero essere fatti oscillare entro limiti abbastanza ampii, senza che i risultati definitivi ne avessero fondamentalmente a soffrire. Non v'ha infatti chi non comprenda tutta l'importanza della fissazione del materiale di studio in soluzioni di formalina, cioè in un liquido di poco costo, sempre pronto, non obbligante a determinati passaggi ed atto alla conservazione di pezzi anche relativamente voluminosi. L'anatomo-patologo, specie nei grandi ospedali, non può, per molte ovvie ragioni, dedicarsi pressochè esclusivamente a ricerche di laboratorio e male si adatta pertanto a tutte quelle che debbono svolgersi in poco lati periodi di tempo.

Per quel che riguarda la riuscita del metodo di B. dopo permanenze diverse dei pezzi in formalina, ritengo di dover confermare, che le oscillazioni dei tempi di fissazione possono essere grandissime: da pochi giorni ad anni. Devesi tuttavia rilevare che la durata minima non può essere inferiore alle 48 ore, che i migliori risultati si ottengono da pezzi rimasti in formalina 10-30 giorni, e che dopo un semestre di permanenza nel fissante la sicurezza della buona riuscita va progressivamente diminuendo.

Poichè nei pezzi rimasti a lungo in formalina, in presenza specialmente di sangue, si forma un precipitato insolubile di emopigmento ferrico, che disturba la buona visione dei preparati, poichè questo inconveniente può essere evitato trasportando i pezzi dalla formalina in alcooli deboli a 70° - 80°, così mi sono preoccupato di stabilire se il metodo riuscisse ancora in sezioni di organi fissati in

formalina per 5-20 giorni e poi conservati in alcool a 70°-80° anche per molto tempo (da pochi giorni a 2-3 mesi). I risultati sono sempre stati buoni e non dissimili da quelli che si ottengono dopo semplici fissazioni in formalina, sempre bene inteso per ciò che riguarda il cosidetto tessuto reticolare od a graticciata. Naturalmente l'alcool, del quale i pezzi sono imbibiti, deve essere allontanato mediante lavatura in acqua corrente. Credo opportuno aggiungere che per pezzi fissati originariamente in formalina e poi rimasti a lungo in alcool a 80°, è giovevole, per quanto non necessario, un secondo passaggio di 24 ore in formalina dopo la lavatura. Anche le sezioni di pezzi fissati in formalina possono essere conservate per qualche tempo in alcool a 70° rimandando così l'esecuzione del metodo di qualche giorno. In questo caso però la sicurezza della riuscita va perduta ed i risultati possono essere tanto buonissimi, quanto mediocri od interamente negativi.

Circa la densità delle soluzioni di formalina è in genere preferibile il servirsi di soluzioni al 10-20 °/₀. Il metodo riesce ugualmente bene anche dopo l'uso di soluzioni più deboli e più forti, 5 e 25 °/₀. Però le soluzioni deboli debbono essere rinnovate con maggiore frequenza il che é poco pratico e quelle forti raggrinzano, come è noto, alquanto i tessuti. Deve considerarsi come norma generica il cambiare almeno una volta il fissante dopo le prime sei ore ed il ritagliare i pezzi specie quando sono piuttosto voluminosi ed irregolari.

Ho sperimentato anche la fissazione in formalina in termostato a 36° senza rilevare importanti differenze di riuscita. Però la permanenza in termostato non deve superare le dieci ore ed è bene evitarla per organi (milza), che contengono molto sangue, perchè può avvenire rapidissimamente la formazione dei noti precipitati di emopigmento ferrico.

Quali fissanti molto in uso in diversi Istituti anatomo-patologici, ho sperimentato il primo bagno di Kayserling ed il liquido di Orth. Qualche saggio ho fatto pure su pezzi che avevano subito il passaggio pei tre bagni di Kayserling ed erano conservati ta tempo nell'ultimo di essi. Pei pezzi conservati da tempo nel terzo bagno di Kayserling i risultati furono sempre completamente negativi. I preparati allestiti da pezzi fissati nel primo bagno di Kayserling sono in genere discreti, però in complesso meno buoni di quelli allestiti da pezzi fissati in formalina. Il liquido di Orth, come pure una miscela di 80 parti di liquido di Müller e 20 parti di formalina (1), possono dare risultati ottimi, superiori, anche per la regolare colorazione dei nuclei e per la perfetta conservazione dei protoplasmi cellulari, a quelli che si ottengono dopo la fissazione in formalina. Però la riuscita è affatto incostante e varia, a parità di ogni altra condizione, senza alcuna precisabile regola. Sembra solo che l'organo od il tessuto in esame abbiano una certa influenza sulla riuscita che è abbastanza costante p. es. pel fegato, meno sicura per la milza, meno ancora pel polmone, nulla per le linfoglandule.

Quando si usi la formalina come fissante pel metodo di B. è bene, per quanto non necessario, preferire quella di Schering alle comune formalina del commercio.

Anche coll'opportuna fissazione dei pezzi in soluzioni di formalina Schering di media densità, il problema della riuscita costante del metodo non poteva essere considerato

(1) Quando si voglia servirsi di miscele di Müller e formalina, e si deve porre attenzione a che i pezzi restino nel fissante non più di 3 giorni e non meno di 30 ore. Il limite medio è di 48 ore.

come affatto risolto. Occorreva fare nuovi tentativi atti a delimitare quanto più possibile la capricciosità del metodo stesso.

Poichè il concetto fondamentale che aveva guidato le mie ricerche, presupponeva che i risultati del metodo dipendessero essenzialmente dalle condizioni nelle quali avveniva la riduzione del nitrato d'argento per opera della formalina, poichè l'esperienza mi aveva insegnato che era precisamente nei preparati allestiti da pezzi fissati in formalina, ma non lavati, che si formavano quelle deposizioni di granuli minutissimi delle quali ho fatto sopra cenno, così mi risolsi a sottoporre i pezzi a lavaggi di varia durata. Riassuntivamente i risultati ottenuti possono essere così espressi:

1. — Le deposizioni finamente granulari sono tanto meno frequenti quanto più i pezzi vengono lavati.

2. — Il lavaggio dei pezzi deve durare non meno di 24 ore, ma non più di tre giorni.

3. — La lavatura deve essere tanto più protratta quanto maggiori sono le dimensioni dei pezzi e relativamente i tempi di permanenza nel fissante.

4. — Un optimum di lavaggio si ottiene lasciando i pezzi sotto l'acqua corrente per circa 30 ore e poi per circa 24 in acqua distillata.

5. — Un lavaggio di uguale durata è indispensabile anche pei pezzi fissati nel primo bagno di Kayserling ed in miscele di liquido di Müller e formalina, come pure pei pezzi conservati in alcool dopo fissazione in formalina.

Col sottoporre i pezzi ad opportuni lavaggi avevo ottenuto altresì il vantaggio di evitare in gran parte la formazione di grossolani precipitati; l'inconveniente però non

essendo interamente eliminato, seguendo sempre lo stesso ordine d'idee, risolsi di lavare anche le sezioni eseguite come di consueto col microtomo a congelazione e di porgere particolare attenzione al modo di preparazione dei bagni di $AgNO_3$.

Il primo punto fu facilmente risolto lasciando le sezioni per 12 ore circa in acqua distillata cambiata un paio di volte. Il secondo richiese qualche ricerca, che merita di essere brevemente illustrata.

Durante la preparazione della nota soluzione di $AgNO_3$ ammoniacale mi era accaduto sovente di rilevare il rapido formarsi di una nubecola grigio-nerastra, che, appena percettibile nel momento nel quale si allestiva la soluzione, s'intensificava poi sempre più nel recipiente ove essa veniva versata per l'uso. Il fenomeno non era costante ma si presentava abbastanza spesso e sembrava indipendente da eventuali minimi residui di formalina o d'altro, rimasti casualmente aderenti ai recipienti in uso, i quali, per maggiore sicurezza, venivano lasciati a lungo sotto l'acqua corrente e risciacquati poi ripetutamente con acqua distillata. Naturalmente l'esecuzione del metodo con soluzioni di $AgNO_3$ ammoniacale non perfettamente limpide dava luogo all'inevitabile formazione di precipitati.

Sospettando che il fenomeno dipendesse, almeno in parte, dall'acqua distillata, sebbene questa non s'intorbidasse affatto nella comune prova con $AgNO_3$, dietro suggerimento del Dott. Giuseppe Maggi, Capofarmacista degli Istituti Ospitalieri, il quale aveva avanzata la supposizione che la cosa potesse stare in rapporto colla occasionale presenza nella comune acqua distillata di residui di composti organici, i quali non vengono eliminati colla solita distillazione dell'acqua potabile, risolsi di tentare la preparazione della soluzione di $AgNO_3$ ammoniacale, con acqua

distillata sul permanganato potassico (1). I risultati furono migliori di quanto si fosse supposto; la nubecola brunastra che oscurava la soluzione di $AgNO_3$ ammoniacale non si presentava più e questa rimaneva perfettamente limpida e chiara durante tutta l'esecuzione propriamente detta del metodo, anche quando veniva usufruita per un numero rilevante di sezioni. Dapprima mi ero limitato all'uso dell'acqua distillata sul permanganato potassico per la sola preparazione del $AgNO_3$ ammoniacale; in seguito me ne servii con vantaggio anche per la preparazione delle due soluzioni necessarie di $AgNO_3$ al 2 e 20 % e per tutti quei passaggi attinenti all'esecuzione propriamente detta del metodo.

---

(1) L'acqua distillata su $KMnO_4$ non si trova, a quanto io sappia, in commercio. A me venne fornita sempre dalla Farmacia degli Istituti Ospitalieri. Ognuno però può facilmente prepararsene le relativamente piccole quantità occorrenti nel proprio laboratorio. Non occorre all'uopo che una storta munita di foro laterale chiuso da un tappo a smeriglio, un refrigerante di Liebig ed un matraccio per raccogliere il distillato. Nella storta si pone acqua comunemente distillata sino a riempirla a metà circa ed un grammo di $KMnO_4$ e si pone a bollire su fiamma a gas protetta da una rete metallica. La storta è naturalmente in comunicazione col refrigerante e questo col matraccio ove si raccoglie il distillato. A misura che l'acqua distilla se ne aggiunge della nuova nella storta a traverso il foro laterale; un'aggiunta di permanganato potassico non è necessaria sino a quando l'acqua nella storta rimanga colorata. È bene gettar via le prime porzioni e le ultime del distillato tenendo solo le intermedie. Le sostanze organiche eventualmente sciolte nell'acqua possono essere: Binarie = C — H, Ternarie = C — H — O, Quaternarie = C — H — O — N. Inoltre prodotti organici combinati con composti inorganici. Il $KMnO_4$ distrugge le sostanze organiche per ossidazione reagendo così:

$C + O_2 = Co_2$
$H_2 + O = H_2O$
$N = N$ oppure forma composti ossigenati di Azoto
$O = O$ coadiuva l'ossidazione.

Non rimaneva per ultimo da risolvere che il particolare problema di ottenere preparati i più chiari possibili. Ciò importava anche perchè col microtomo a congelazione solo dificilmente e raramente si possono ottenere sezioni utilizzabili di una grande finezza.

Gli artifici ai quali vantaggiosamente ricorsi sono stati due. Col primo cercai di ridurre la quantità di soda caustica da aggiungersi al $Ag\,NO_3$ per prepararne la soluzione ammoniacale, il secondo consistette nell'allungare la soluzione medesima ad una quantità maggiore di quella indicata originariamente da B.

Da tentativi diversi fatti in proposito mi è risultato che la quantità minima indispensabile della nota soluzione di soda caustica al 40 $^0/_0$ è di due goccie (da misurarsi con una pipetta bene affinata). Un'aggiunta di poco superiore (3 goccie) rinforza già notevolmente l'impregnazione del cosidetto tessuto a graticciata; una maggiore quantità dà luogo alla formazione di precipitati.

Anche l'allungamento della soluzione di $AgNO_3$ ammoniacale fu determinato mediante tentativi empirici dai quali ho potuto concludere, che il limite medio da preferirsi è quello di 50 cc. Un allungamento di poco minore o maggiore (a 75 ed a 35-40 cc.) può essere utile in singoli casi, a seconda dello spessore minore o maggiore delle sezioni, dell'utilità di una più o meno intensa impregnazione, e via dicendo.

Le soluzioni di $AgNO_3$ ammoniacale piuttosto o molto diluite, specie quando siano ottenute con acqua distillata sul $KMnO_4$ presentano il notevole vantaggio di poter servire per un numero rilevante di sezioni (sino a 20-25 in uno stesso recipiente). Il tempo della permanenza delle sezioni nelle soluzioni di $AgNO_3$ ammoniacale aumenta un

poco coll' accrescersi della sua diluizione. Per diluizioni medie (a 50 cc.) il tempo di permanenza è di circa 20'.

Particolari ricerche ho instituito al fine di stabilire se convenisse o meno servirsi di soluzioni di formalina meno forti del consueto per l' ultimo passaggio delle sezioni; non me ne risultarono però particolari vantaggi di guisa che mi sono poi sempre servito della soluzione al 20 °/₀ indicata da B.

Credo infine utile aggiungere che cooperano alla buona riuscita del metodo e ad evitare la formazione di precipitati la cura scrupolosa di filtrare di volta in volta le due soluzioni di nitrato d' argento necessarie per l' esecuzione del metodo. Anche la soluzione di formalina al 20 °/₀ per l' ultimo passaggio (da prepararsi con acqua fontis) è bene venga filtrata prima dell' uso.

Le ricerche da me fatte per stabilire per quanti giorni sia possibile lasciare le sezioni nella soluzione di $Ag\,NO^3$ al 2 °/₀ senza che la riuscita del metodo ne venga fondamentalmente compromessa mi permettono di affermare:

1. — La permanenza minima non può essere inferiore alle 6 ore; la massima a tre giorni.

2. — Il recipiente contenente $Ag\,NO_3$ al 2 °/₀ e le sezioni deve essere tenuto all' oscuro.

3. — Quando sia assolutamente impossibile eseguire il metodo dopo oltre tre giorni di permanenza delle sezioni nella soluzione di $Ag\,NO_3$ al 2 °/₀ e non si vogliano sacrificare le sezioni stesse, si può ricorrere all' artificio di rinnovare la soluzione. Si guadagnano così altre 48 ore circa.

4. — Il bagno in $Ag\,NO_3$ al 2 °/₀ non può essere eliminato.

Dopo quanto sono venuto dicendo, parmi utile, per ogni maggiore chiarezza, il riassumere brevemente le diverse manualità del metodo, riprecisando così le modificazioni da me introdottevi.

1. — Fissare in formalina ai 10-20 % per un minimo di 48 ore. Lasciare i pezzi nel fissante possibilmente non più di un mese. Invece della formalina si può usare liquido di Kayserling primo bagno oppure miscele di liquido di Müller e formalina; il tempo di fissazione è però in quest'ultimo caso ridotto a 48 ore.

2. — Lavare in acqua corrente per circa 30 ore; trasportare i pezzi in acqua distillata per altre 24 ore circa.

3. — Sezionare col microtomo a congelazione; sezioni di 10-20 micron da raccogliersi in acqua distillata comune trasportandole poi in acqua distillata su $KMnO_4$ e lasciandovele per circa 24 ore.

4. — Sciacquare nuovamente le sezioni in acqua distillata su $KMnO_4$. Trasportarle in una soluzione di $AgNO_3$ al 2 % in acqua distillata su $KMnO_4$, filtrata al momento dell'uso attraverso carta lasciarvele per un minimo di 6 ore, un massimo di 3 giorni, all'oscuro. Il liquido deve essere molto abbondante. Le sezioni non devono essere sovrapposte le une alle altre.

5. — Esecuzione del metodo propriamente detto.

a) Preparazione del $AgNO_3$ ammoniacale: A 5 cc. di una soluzione di $AgNO_3$ al 20 % in acqua distillata sul $KMnO_4$ si aggiungono due goccie di una soluzione al 40 % di $NaOH$; successivamente, goccia a goccia, tanta ammoniaca sino a dissoluzione del precipitato formatosi; quando la soluzione è ritornata limpida, aggiungere ancora una goccia di ammoniaca; allungare la soluzione così ottenuta a 40-70 cc. Filtrare attraverso carta dopo avere lavato il filtro con acqua distillata su $KMnO_4$.

b) Colorazione: le sezioni vengono trasportate, una ad una, mediante ansa di vetro, nella soluzione di $AgNO_3$ ammoniacale, facendole passare prima rapidamente per un bagno d'acqua distillata su $KMnO_4$. Nel recipiente contenente la soluzione di $AgNO_3$ ammoniacale le sezioni vengono disposte in serie determinate, in modo da poterle passare nei bagni successivi nello stesso ordine. In 50 cc. di soluzione di nitrato d'argento ammoniacale si possono portare sino 20-25 sezioni. Il tempo di permanenza è di circa 20'. Successivamente le sezioni vengono fatte passare rapidamente attraverso un nuovo bagno di acqua distillata sul permanganato e immerse in una soluzione di formalina al 20 % preparata con acqua fontis e filtrata al momento dell'uso. Quando tutte le sezioni sono trasportate, si rinnova la soluzione di formalina con altra fresca. Quivi le sezioni rimangono da 12 a 24 ore.

Tutti i trattamenti successivi sono identici a quelli indicati da B. Per essi è affatto inutile l'uso d'acqua distillata su $KMnO_4$. Le sezioni lavate, passate pei successivi bagni di cloruro d'oro, d'iposolfito ed'acqua distillata comune, si raccolgono in alcool a 70° dove possono permanere senza alterarsi anche parecchi giorni. Dall'alcool a 70° si trasportano in alcool a 95° e poi in xilolo fenato, dal quale si montano senz'altro in balsamo.

Quando interessi, come spesso avviene, di avere una colorazione del fondo e dei nuclei, i quali, specialmente dopo la fissazione dei pezzi in formalina restano quasi completamente incolori, si può servirsi con molto vantaggio e praticità del carminio litico di Orth (Grübler). In tal caso invece di raccogliere le sezioni dall'acqua in alcool a 70°, si passano direttamente nel colore e vi si lasciano 4-5 ore. Da questo si trasportano direttamente (senza lavare) in

alcool cloridrico (alcool a 70° p. 100, Hcl puro p. 1), ove in capo ad una ventina d'ore sono perfettamente differenziate. Si passano infine per alcool a 95° tinto appena in giallo con un paio di goccie di soluzione satura alcoolica di acido picrico. Di qua per ultimo direttamente in xilolo fenato. Montare in balsamo.

Nei preparati bene riusciti il cosidetto tessuto reticolare risalta per la sua tinta uniformemente nera; i grossolani fasci connettivali si presentano con gradazioni diverse di violaceo; i nuclei sono rosei coi maggiori granuli cromatici brunastri o nerastri; i protoplasmi cellulari, giallastri; i globuli rossi, giallo intenso.

Ho applicato con successo la sopraesposta modificazione del metodo di Bielschowsky allo studio del cosidetto tessuto reticolare del fegato, del rene, della milza, del pancreas, delle ghiandole linfatiche, del polmone di molti tumori dell'uomo. I risultati furono sempre buoni e dimostrativi, anche quando i pezzi erano stati raccolti d' estate, oltre 24 ore dopo la morte.

Circa l'applicabilità della modificazione descritta allo studio del sistema nervoso ed allo studio del tessuto a graticciata degli organi parenchimali degli animali mi riserbo di esporre alcune considerazioni in una ulteriore comunicazione. Pure ad altro lavoro mi sembra opportuno rinviare alcune considerazioni riguardanti le modificazioni, proposte da altri autori del metodo di Bielschowsky, e delle quali per ciò ho questa volta espressamente taciuto.

Milano, Giugno 1914.

PAVIA PREMIATA TIPOGRAFIA SUCCESSORI FRATELLI FUSI 1914